Münster. 1931. No 26

Med Dis

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde

der

hohen medizinischen Fakultät

der

Westfälischen Wilhelms-Universität Münster i. W.

Vorgelegt von

Waldemar Grigo, Zahnarzt

aus

Gr. Lasken (Ostpreußen)

1931

Buchdruckerei Bernhard Schenk, Münster (Westf.), Hammer Straße 77

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Referent: Professor Dr. Freund

Dekan: Professor Dr. Vogt

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Westf.)

Meinen lieben Eltern

gewidmet.

Die Einwirkung der Monobromessigsäure auf Dehydrierungsvorgänge.

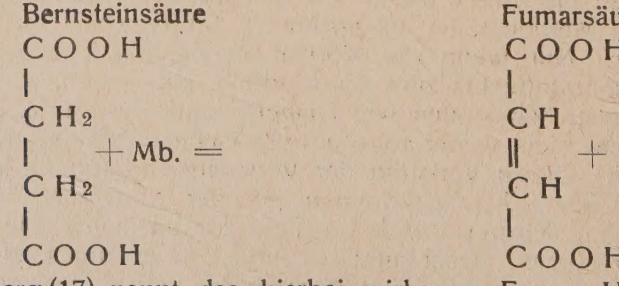
A. Einleitung.

Ueber die Vorgänge innerhalb des lebenden Organismus beim Abbau zugeführter Nahrungsstoffe geben uns die zahlreichen Veröffentlichungen von Thunberg [15]) einen klaren Ueberblick. Er geht dabei von Schönbeins Theorie [13]) aus, wonach „zwischen dem Anfangsstadium und dem Endstadium auch scheinbar sehr einfacher chemischer Prozesse verschiedene Zwischenglieder eingeschoben sind." Die Uebertragung dieser für die praktische Chemie wichtigen Theorie auf die Lebensvorgänge innerhalb des Körpers, wonach man das Entstehen der Zwischenglieder des intermediären Stoffwechsels innerhalb der Zellen an bestimmte Moleküle gebunden glaubte, erwies sich bald als irrig. Man hat deshalb diese Theorie auch bald aufgegeben. Statt dessen betrachtete man die Zelle als ein „heterogenes, vielphasiges System", in welchem die Nährstoffe von Enzymen umgewandelt werden. Bei dieser chemischen Umsetzung eines Nährstoffes in der Zelle, z. B. Zucker in Wasser und Kohlensäure, müssen sämtliche Zwischenstadien vorhanden sein.

Der Nachweis dieser Zwischenprodukte durch direkte analytische Methoden ist bei normalem Stoffwechsel nur selten anwendbar. Nur wenn der Körper die Fähigkeit verloren hat, einzelne Nährstoffe bis zum Endstadium abzubauen, z. B. bei pathologischen Zuständen wie Diabetes und Cystinurie, gelingt es manchmal, nicht weiter abgebaute Zwischenprodukte analytisch festzustellen. Durch Variation der Versuchsbedingungen glaubte man dem Ziele näher zu kommen. In der Annahme, daß die Fähigkeit des Körpers und einzelner Organe, ihm zugefügte Stoffe umzusetzen, beschränkt ist, und daß er zugesetzte Substanzen nur umsetzt, die er normalerweise selbst umsetzt, führt man ihm oder dem überlebenden Organ hypothetische Zwischenglieder einer Reaktionskette zu und untersucht dann, ob Umsetzung eingetreten ist. Ist das der Fall, so wird es als wahrscheinlich angesehen, daß die zugeführte Substanz ein Glied des normalen Stoffwechsels ist. Diese Ausprobier- oder Auf-

suchungsmethode ist jedoch nicht einwandfrei. So wird z. B. Äthylalkohol im Körper sehr leicht verbrannt, obwohl derselbe als Stoffwechselprodukt bisher nicht nachgewiesen wurde. Andererseits regen eine Reihe von Stoffen, die Thunberg [14]) zuerst, später auch Battelli und Stern (1)(2) untersucht hatte, wie Bernstein-, Zitronen-, Aepfel- und Fumarsäure den Gasaustausch überlebenden Froschmuskels stark an, woraus man folgern durfte, daß diese Stoffe normale Zwischenprodukte bei der Verbrennung der Fettsäuren sind. Einbeck hat dies bestätigt, indem es ihm gelang, Bernsteinsäure (4) und Fumarsäure (5) als Bestandteil frischen Fleisches nachzuweisen.

Eine neue Methode, Zwischenprodukte des intermediären Stoffwechsels aufzusuchen, ist das Methylenblauverfahren nach Thunberg. Schon Dreser(3) hatte 1885 beobachtet, daß tierisches Gewebe den Thiazinkörper Methylenblau zu seiner farblosen Leukobase zu reduzieren vermag. Kurz danach benutzte Ehrlich das Methylenblau für seine bekannten Untersuchungen über „das Sauerstoffbedürfnis des Organismus". Das Verfahren nach Thunberg besteht im Zusetzen von eventuellen Stoffwechselprodukten zu tierischen Geweben und der Beobachtung, inwiefern der fragliche Stoff mit dem Gewebe in Reaktion tritt. Als Indikator dient eine sehr leicht wahrnehmbare Farbreaktion, nämlich die Ueberführung des Methylenblaus in seine Leukoverbindung bei Abwesenheit von Luftsauerstoff. Thunbergs Methode wird durch die Wielandsche (19) Oxydationstheorie begründet, wonach gewisse Oxydationen zunächst als Dehydrierungen aufzufassen sind. Nicht dem Sauerstoff, sondern dem Wasserstoff kommt hierbei die aktive Rolle zu. Wieland bezeichnet es als sauerstofflose „Oxydation". Die bei der Dehydrierung entstehende Leukobase entspricht dem Wasserstoffsuperoxyd bei der normalen Oxydation. Als Beispiel führt Thunberg (16) die Oxydation der Bernsteinsäure an, die bei Gegenwart von Methylenblau unter Luftabschluß vermittels eines Gewebeenzyms in Fumarsäure umgewandelt wird:



Thunberg (17) nennt das hierbei wirksame Enzym Hydrogenotransportase oder Dehydrogenase, die zugeführten Stoffe Wasserstoffdonatoren oder Donatorsubstanzen. Die Reduktion des Methylenblaus zu seiner Leukobase wird durch das Gewebe bewirkt, und zwar durch die entsprechende Dehydrogenase, welche von der Donatorsubstanz aktiven Wasserstoff abspaltet

und ihn an das Methylenblau abgibt. Hierbei ist das Methylenblau der Wasserstoffakzeptor. Da die bei dieser Reaktion nur auf die Bernsteinsäure einwirkende Hydrogenotransportase den Wasserstoff nur von Bernsteinsäure abgespalten haben kann, nennt Thunberg (18) dieses Enzym „Succinodehydrogenase". Wenn nun auch andere Stoffe die Reduktion des Methylenblaus durch tierisches Gewebe beschleunigen, kann man für diese Substanzen spezifische Enzyme auffinden. Da die Zellen für die zugeführten Substanzen ein spezifisch eingestelltes Enzym bereit haben, so ist daraus zu folgern, daß diese Stoffe Zwischenglieder des intermediären Stoffwechsels sind.

Hierfür bietet also die Methylenblaumethode eine besonders bequeme Möglichkeit. Von Vorteil ist hierbei auch die Verwendung nur geringer Gewebsmengen. Außerdem zeichnet es sich durch seine Einfachheit und Genauigkeit aus. Es ist nur die Zeit zu bestimmen, in welcher eine gegebene Menge Methylenblau unter dem Einfluß einer Suspension feinverteilten Gewebes und der zu untersuchenden Donatorsubstanz im Vakuum entfärbt wird. Der gasanalytischen Methode hat das Methylenblauverfahren den Vorteil der größeren Empfindlichkeit voraus.

Mit dieser Methode hat Thunberg festgestellt, wie auch vorher erwähnt wurde, daß Bernstein-, Aepfel-, Fumar- Zitronen- und Milchsäure den Gasaustausch des überlebenden Froschmuskels steigern und somit Zwischenprodukte des intermediären Stoffwechsels sind. Auch ohne Gegenwart eines fremden Wasserstoffakzeptors wie das Methylenblau findet unter anderen Bedingungen eine Dehydrierung statt, wie die Arbeiten am Physiologischen Institut in München ergeben haben. Hahn und Haarmann konnten nachweisen, daß eine Dehydrierung der Bernsteinsäure (6) (7), Fumarsäure (6) (7), Aepfelsäure (8) (9), Milchsäure (10), Zitronensäure (11), Hexosediphosphorsäure, Propionsäure und Glycerinphosphorsäure (12) stattfand. Diese Ergebnisse sind eine starke Stütze für die Wielandsche Theorie.

Die nun folgenden Versuche wurden z. T. mit denselben oben erwähnten Donatorsubstanzen angestellt, jedoch mit und ohne Zusatz von Monobromessigsäure. Denn aus den am hiesigen Institut angestellten bisher unveröffentlichten Arbeiten von Dr. Haarmann geht hervor, daß aus dem in den Organen enthaltenen Nährmaterial, so wie aus zugeführter Glukose und zugeführtem Glykogen bei Einwirkung der Monobromessigsäure keine Milchsäure gebildet wird. Als weitere Stufe des Kohlehydratabbaus ist die Hexosemonophosphorsäure (Embdenester) anzusehen, aus der die Milchsäurebildung ebenfalls durch Monobromessigsäure gehemmt wird. Dagegen wird die Milchsäurebildung aus niedrigen Molekülen durch Monobromessigsäure nicht mehr beeinflußt. In diesen Versuchen wurden ledig-

lich die anaeroben Spaltungsvorgänge, die als Vorstufen der Milchsäurebildung anzusehen sind, untersucht. In meinen Versuchen habe ich die Beeinflussung der Dehydrierungsvorgänge mit der Methylenblaumethode untersucht.

Ferner wird, wie oben erwähnt, aus den Estern der Phosphorsäure mit Zucker, aus Hexosemonophosphorsäureester und Hexosediphosphorsäureester unter der Einwirkung der Monobromessigsäure keine Milchsäure gebildet. Ungeklärt ist dabei die Frage, wo der Angriffspunkt der Monobromessigsäure zu suchen ist. Es könnte zunächst durch die Monobromessigsäure die Esterspaltung verhindert werden oder aber die Milchsäurebildung aus den entstandenen Reaktionsprodukten. Hierzu diente die kolorimetrische Bestimmung der freien Phosphorsäure.

In noch unveröffentlichen Versuchen von Dr. Haarmann hatte sich gezeigt, daß die Milchsäurebildung auch durch einige andere Stoffe aufgehoben oder gehemmt wird, die ähnlich wie die Monobromessigsäure brom-substituierte aliphatische Verbindungen sind. Dies sind die Schlaf- oder Beruhigungsmittel: Neodorm und Avertin. In einigen Versuchsreihen wurde deshalb auch die Wirkung dieser Stoffe auf die Methylenblauentfärbung untersucht, und mit der Monobromessigsäurewirkung verglichen.

B. Methodik.

a) Methylenblaumethode.

Die Organe soeben abgetöteter Versuchstiere werden sorgfältig von Verunreinigungen, Faszien und Fett befreit und mit einer scharfen „Cooperschen Scheere" zu einem homogenen Brei zerschnitten. In die von Thunberg angegebenen Vakuumröhren, die ungefähr 10 cm fassen und ein Seitenrohr besitzend, welches durch Drehen des eingeschliffenen Glasstöpsels abgesperrt werden kann, kommen folgende Zusätze:

I. Gleiche Mengen Gewebe (200 mg.)
II. Gleiche Mengen einer Methylenblaulösung.
III. Die zu untersuchende Substanz.

Die Flüssigkeitsmenge übersteigt nicht ein ccm, die Differenz dazu wird durch destilliertes Wasser, in Paralellversuchen durch Monobromessigsäure ausgefüllt. Die Ansätze hatten folgende Zusammensetzung:

Rohr 1	Rohr 2
ohne Monobromessigsäure	mit Monobromessigsäure
0,2 gr. Gewebe	0,2 gr. Gewebe
0,8 ccm H_2O	0,4 ccm Aqua dest.
	0,4 ccm Monobrom.
0,2 ccm Methylenblau in Phosphatpuffer	0,2 ccm Methylenblau in Phosphatpuffer

Rohr 3	Rohr 4
ohne Monobromessigsäure	mit Monobromessigsäure
0,2 gr. Gewebe	0,2 gr. Gewebe
0,4 ccm zu unters. Subst.	0,4 ccm zu unters. Subst.
0,4 ccm Aqua dest.	0,4 ccm Monobrom.
0,2 ccm Methylenblau in Phosphatpuffer	0,2 ccm Methylenblau in Phosphatpuffer

u. s. w.

Durch das Seitenrohr wird jedes Röhrchen mit der Oelluftpumpe 1 bis 2 Min. kräftig evakuiert in den Thermostaten gestellt, der Wasser von konstanter Temperatur (37°) enthält. Die Zeit des Einsetzens und der völligen bezw. teilweisen Entfärbung wird notiert. Die Differenz ist dann die Entfärbungszeit in Minuten. In den Versuchen wurde nur zum Teil mit unausgewaschenen Organen gearbeitet, da auch das Kontrollröhrchen, welches keine Donatorsubstanz enthielt, sich rasch entfärbte und somit ein Vergleich mit anderen Röhren ungenau wurde. Um diese störende Restreduktion aufzuheben, ist es zweckmäßig, das Gewebe auszuwaschen. Benutzt man destilliertes Wasser, so wird die Milchsäuredehydrase vollständig ausgewaschen, während die Dehydrase der Bernsteinsäure zurückbleibt. Dagegen wird beim Auswaschen mit Phosphatpufferlösung ($P_H = 7{,}0$; m/15) ohne Schädigung der Dehydrasen die Restreduktion praktisch ausgeschaltet. (10) Zu diesem Zweck wird das zerkleinerte Gewebe dreimal je 15 Min. mit der zehnfachen Menge Phosphatpuffer ($P_H = 7{,}0$, m / 15 in der Schüttelmaschine gewaschen und jedesmal durch ein Leinentuch scharf abgepreßt.

Die Methylenblaukonzentration wurde in der Lösung 1 : 1000 bei unausgewaschenem, 1 : 5000 bei ausgewaschenem Gewebe gebraucht. Als Donatorsubstanzen wurden die neutralen Salze der betreffenden Säuren in 1 %iger Lösung verwendet. In den Versuchen VI und VII wurde durch Wasser extrahierte Kaninchenmuskulatur gebraucht. Zum Auffüllen auf 1 ccm wurde statt Wasser Hexosediphosphorsäure zugesetzt. Die Neodorm- und Monobromessigsäurekonzentration angefangen von 1 : 100 waren in den folgenden Röhren um das doppelte verdünnt. Da davon 0,4 ccm in 1,2 ccm Versuchsansatz enthalten waren, war die tatsächliche Konzentration 1 : 300; 1 : 600 u. s. w.

B. Kolorimetische Phosphatbestimmung.

Die Phosphorsäure wurde nach dem Verfahren von Fiske und Subbarrow in der Modifikation von Lohmann und Jendrassik (14) bestimmt.

Als Versuchsmaterial diente Kaninchenmuskulatur, welche dreimal durch destilliertes Wasser extrahiert worden war. Die Ansätze hatten folgende Zusammensetzungen:

I	II
5 gr. Muskel	5 gr. Muskel
10 ccm Aqua dest.	5 ccm Aqua dest.
	5 ccm Monobrom
10 ccm Na-Bicarb. 1%	10 ccm Na-Bicab. 1%
III	IV
5 gr. Muskel	5 gr. Muskel
5 ccm Aqua dest.	5 ccm Monobrom
5 ccm zu unters. Subst.	5 ccm zu unters. Subst.
10 ccm Na-Bicarb. 1%	10 ccm Na-Bicarb. 1%

u. s. w.

Die untersuchten Substanzen waren:

1) Hexosediphosphorsaures Natrium
   Es enthielt: 11,79 % org. Phosphor
   0,51 % anorg. Phosphor
   17,14 % Natrium
2) Clycerinphosphorsaures Natrium (Merck)
3) Embdenester, der nach der Vorschrift von Hahn, Fischbach und Haarmann (13) hergestellt wurde als Na-Salz aus Hexosemonophosphorsaurem Barium, durch Umsetzung mit der berechneten Menge Na_2SO_4 hergestellt.

Die Ansätze wurden in Thermostaten bei 38° 4 Stunden digeriert. Von allen Ansätzen wurden Parallelbestimmungen direkt gemacht. So vorbehandelt, wurden sie in je 100 ccm fassende Messkolben gebracht, mit 50 ccm 10 %iger Trichloressigsäure enteiweißt und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Vom Filtrat wurden für die Bestimmung je nach dem Phosphatgehalt 11—14 ccm mit Wasser ausgefüllt. Hierzu kamen noch folgende Zusätze

5 ccm Molybdatlösung
1 ccm Eikonogen

Gesamtvolumen stets 20 ccm. Die so hergestellten Lösungen wurden 7 Min. im Wasserbad bei 38° gelassen und nach Abkühlung im Autenrieth-Kolorimeter mit einer Lösung von bekanntem Phosphatgehalt verglichen.

Als Enteiweißungsmittel wurde deshalb Trichloressigsäure benutzt, weil andere Enteiweissungsmittel, wie z. B. Schwermetallsalze mit dem zugesetzten Molybdat Fällungen geben würden, durch die kolorimetrische Bestimmungen unmöglich wären. Die für die Phosphatbestimmung nötigen Lösungen waren von folgender Zusammensetzung:

1) Ammoniummolybdat
   $2\frac{1}{2}$% in 5 n H_2SO_4
2) Eikonogen 0,25%

zusammengesetzt aus:

$NaHSO_3$	30,0
Na_2SO_3	1,0
Aqua dest. ad.	200,0

dazu nach Lösung Eikonogen 0,5 gr

3) Phosphatstandardlösung.

4,386 gr. KH_2PO_4 (nach Sörensen)

in 1 Ltr. Wasser.

1 ccm davon entspricht 1 mg. P = 2,29 mg. P_2O_5

Zum Gebrauch wird diese Lösung auf das 20. fache verdünnt.

Die Keilfüllung enthält:

4 ccm verdünnte Standardlösung
10 ccm Aqua dest.
5 ccm Molybdatlösung
1 ccm Eikonogen

Die hier verwendete Molybdänsäure wird durch starke Reduktionsmittel z. B. Schwefelwasserstoff und Zinnchlorür zu einer blau gefärbten Molybdänverbindung reduziert. Bei Phosphormolybdänsäure erfolgt die Reduktion schon durch schwache Reduktionsmittel, wie z. B. den photographischen Entwickler „Eikonogen". Je nach dem Phosphatgehalt der so behandelten Lösungen tritt eine verschieden starke Blaufärbung ein, welche mit der Keillösung von bekannten Phosphatgehalt verglichen wird.

C. Versuchsergebnisse.

Tabelle I.

Versuche an ausgewaschenen Organen.
Versuchstier Kaninchen.

Untersuchte Substanz	Monobrom.	I	II	III	IV	V
Null-Versuch	ohne	9	24	80	73	136
	mit	25	24	81	140	150 ++(+)
Glukose	ohne	5	19	31	70	55
	mit	25	32	90	141	80
Glykogen	ohne	—	—	69	—	58
	mit	—	—	106	—	140 ++
Organe		Niere	Herz	Lunge	Lunge	Muskel

Anmerk:

\+ etwas entfärbt
++ stark entfärbt
++(+) fast ganz entfärbt
+(+) ungefähr halb entfärbt.

Im unausgewaschenem Gewebe sind die Entfärbungszeiten sehr kurz, weil die Restreduktion, die durch das im Gewebe vorhandene Nährmaterial bedingt ist, sehr groß ist. Unter der Einwirkung von Monobromessigsäure werden die Entfärbungszeiten erheblich verlängert, ein Zeichen dafür, daß nicht mehr alles Brennmaterial dehydriert wird. Während Glukose und Glykogen die Entfärbungszeit von Methylenblau verkürzt, bleibt diese Beschleunigung durch Monobromessigsäure aus. (Tabelle I.)

Tabelle II.

Versuche an ausgewaschenen Organen.
Benutzte Lösung: Phosphat-Puffer.

Untersuchte Substanz	Monobrom.	I	II	III	IV	V	VI
Null-Versuch	ohne	90	∞	∞	42	180 +	133
	mit	140 +	∞	∞	59	∞	∞
Glukose	ohne	61	98	99	30	180 ++(+)	110
	mit	∞	∞	∞	64	∞	∞
Fruktose	ohne	61	103	90	—	—	—
	mit	∞	∞	∞	—	—	—
Glykogen	ohne	65	127	102	28	149	123
	mit	∞	∞	∞	54	∞	∞
Tierart		Frosch			Kaninchen		
Organ		Muskel			Niere	Musk.	Herz

Wie aus Tabelle II hervorgeht entfärben Glukose und Fruktose gleich schnell, während das Glykogen etwas langsamer wirkt. Die Monobromessigsäure verhindert eine Entfärbung vollkommen, am ausgeprägtesten beim Froschmuskel, sowie am Herzmuskel und Skelettmuskel des Kaninchen, während beim Nierengewebe nur eine starke Verzögerung eintritt.

Tabelle III.

Versuche am ausgewaschenen Froschmuskel
Benutzte Lösung: Phosphat-Puffer

Untersuchte Substanz	Monobrom.	I	II	III	IV	V	VI	VII
Null-Versuch	ohne	90	∞	∞	120	120	67	87
	mit	140 +	∞	∞	∞	∞	∞	∞
Milchsäure	ohne	29	33	65	45	71	38	41
	mit	127	180	240	123	120	81	126
Bernsteinsäure	ohne	24	26	36	45	—	—	—
	mit	31	35	42	123	—	—	—
Fumarsäure	ohne	60 ++(+)	98 +	∞	∞	—	—	—
	mit			∞	∞	—	—	—
Äpfelsäure	ohne	60 ++(+)	43	183 (+)	60 +(+)	90 +)	—	—
	mit		39				—	—
Weinsäure	ohne	—	—	—	—	86	65	69
	mit	—	—	—	—	∞	∞	∞
Zitronensäure	ohne	—	—	—	—	—	38	47
	mit	—	—	—	—	—	48	50
Alanin	ohne	—	—	—	—	81	63	79
	mit	—	—	—	—	∞	∞	∞
Asparagin	ohne	—	—	—	—	11	64	72
	mit	—	—	—	—	∞	105 +(+)	104 +(+)

Tabelle IV.

Versuche an ausgewaschenem Muskel

Nr.	Null-Versuch		Hexosediphosphorsäure		Glycerinphosphorsäure		Embdenester		Tierart	Bemerkung
	Monobromessigsäure									
	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit		
I	90	140	44	∞	—	—	—	—	Frosch	I.—VI. ausgewaschen in Puffer
II	∞	∞	127	∞	54	∞	—	—	„	
III	120	∞	106	∞	39	103 +(+)	80 ++	92 ++	„	
IV	120	∞	68	120 +(+)	38	115 +(+)	40 ++	100 ++	„	
V	67	∞	53	106 +(+)	42	100	—	—	„	
VI	87	∞	64	∞	67	∞	—	—	„	
VII	287	—	187		20	71	—	—	„	VII—XV. ausgewaschen in Aqua dest.
VIII	300	—	209	∞	24	125	—	—	„	
IX	300	—	240	∞	22	110	—	—	„	
X	180 (+)	—	100	∞	24	61	—	—	Kaninchen	
XI	∞	—	140	∞	18	88	—	—	Frosch	
XII	75 ++	—	60	∞	9	18	—	—	Kaninchen	
XIII	85		81	∞	11	26	—	—	„	
XIV	—	—	—	—	—	—	41	100	Meerschweinchen	
XV	—	—	—	—	—	—	65	∞	Frosch	

Tabelle V.

Versuche am ausgewaschenen Froschmuskel.

Untersuchte Substanz	Null-Vers.	Glykogen	Glukose	Fruktose
Ohne Monobr.	23	—	—	—
mit Monobrom	52	—	—	—
Avertin	145 +	135 +	135 +	130 +
Neodorm	∞	∞	∞	∞

Tabelle VI.

Versuche an ausgewaschenem Kaninchenmuskel.

Neodorm	I	II	III
Null-Vers.	15	29	31
1: 100	59	226 +	∞
1: 200	24	184	85
1: 400	20	44	72
1: 800	20	44	41
1: 1600	20	43	40
1: 3200	20	40	40
1: 640	19	39	38
1: 12800	15	35	31
1: 25600	15	—	31

Tabelle VII.

					Monobrom	I	II	III
					Null-Vers.	24	26	30
1:	300	1:	100	∞	100 +	∞
1:	60	1:	200	44	92	114
1:	1200	1:	400	43	44	99
1:	2400	1:	800	38	41	85
1:	4800	1:	1600	35	33	52
1:	9600	1:	3200	27	30	43
1:	19200	1:	6400	24	26	33
1:	38400	1:	1 800	24	26	33
1:	76800	1:	25600	24	—	—

Die Versuche mit ausgewaschenem Froschmuskel zeigen eine vollständige Hemmung im Nullversuch bei Anwesenheit der Monobromessigsäure. Während die Entfärbung der Bernsteinsäure und des Asparagin nur gering gehemmt wird, wird die Dehydrierung der Milchsäure stark gehemmt. Bei Weinsäure und Alanin ist die Hemmung vollkommen. All diese Substanzen entfärben aber ohne Monobromessigsäurezusatz rascher als der Nullversuch. Apfel- und Fumarsäure entfärben im ersten Versuch mit und ohne Monobromessigsäure sehr rasch, jedoch ohne völlig zu entfärben. Nach Erreichen eines bestimmten Farbtons bleibt der Prozess stehen, es handelt sich dabei um eine Gleichgewichtsreaktion. (Tabelle III)

Am stärksten aktivierend wirkt Glycerinphosphorsäure, etwas schwächer Embdenester, am schwächsten Hexosediphosphorsäure. Vollständige Hemmung durch Monobromessigsäure tritt bei Hexosediphosphorsäure ein, starke bei Glycerinphosphorsäure und Embdenester. (Tabelle IV)

Tabelle VIII. a.

Kolorimetische Phosphatbestimmung
Versuche am ausgewaschenem Kaninchenmuskel.
mg P/l g Gewebe.

Nr.	Untersuchte Substanz	Monobrom	I.	II.	III.	IV.
1.	Null-Versuch	ohne	0,220	0,078	0,074	0,08
		mit	0,176	0,074	0 062	0.078
2.	Hexosediphosphorsäure	ohne	0.720	0.34	0.394	0.340
		mit	0,620	0.32	0.32	0,325
3.	Embdenester	ohne	—	—	0,186	—
		mit	—	—	0,176	—
4.	Glycerinphosphorsäure	ohne	—	0,18	0,192	0,170
		mit	—	0,16	0,172	0,165
	direkt wie 1	ohne	0,174	0,032	0,05	0,34
	„ 2	„	0,21	0,066	0,09	0,072
	„ 3	„	—	—	0,062	—
	„ 4	„	—	0,032	0,062	0,046

Tabelle VIII. b.

Phosphatabspaltung. mg. P/l gr. Gewebe.

Untersuchte Substanz	Monobrom	I	II	III	IV
Hexosediphosphorsäure	ohne	0,464	0,228	0,280	0,222
	mit	0,408	0,217	0,218	0,209
Embdenester	ohne	—	—	0,100	—
	mit	—	—	0,102	—
Glycerinphosphorsäure	ohne	—	0,102	0,106	,078
	mit	—	0,096	0,098	0,075

Versuchsreihe V.

In den folgenden Versuchsreihen 5 u. 6 wurde außer der Monobromessigsäure die Wirkung von Avertin und Neodorm untersucht. Beide enthalten Brom in aliphtatischer Bindung und zeigen nach unveröffentlichten Versuchen von Haarmann die Fähigkeit, die Milchsäurebildung im Gewebe herabzusetzen.

Während im Nullversuch die Monobromessigsäure den Entfärbungsprozess um 29 Min. verzögert, hemmt das Avertin um mehr als 2 Stunden, das Neodorm vollständig. Bei Zusatz von Glukose, Fruktose und Glykogen zeigt Avertin die gleich starke Hemmung wie im Nullversuch. Neodorm bewirkt wiederum völlige Hemmung. Pararellversuche mit Urethan und Luminal zeigten keine Einwirkung. Es handelt sich also nicht um eine allgemeine Wirkung der Hypnotika. Die hemmende Wirkung des Neodorms ist noch stärker als die der Monobromessigsäure.

Versuchsreihe VI u. VII.

In den Versuchreihen VI u. VII wurden die Grenzkonzentrationen von Neodorm und Monobromessigsäure, die noch hemmend wirkten, festgestellt. Sie liegen bei der Monobromessigsäure bei einer Konzentration von ca. 1/20000, bei Nedorm bei 1/40000. Bei hohen Konzentrationen ist die Hemmung vollständig.

Versuchreihe VIII a.

Als Mass der Spaltung von Ester der Phosphorsäure mit Zucker dient die koloremetrische Bestimmung des freien Phosphats, deren Ergebnis in mg. auf 1 gr. Gewebe in Tab. VIII a zusammengestellt ist.

Versuchsreihe VIII b.

Der besseren Uebersicht wegen wurde in Tabelle VIII b. nur die aus den Estern abgespaltene Phosphorsäure angegeben. Man muß dabei die im Gewebe ohne Zusatz gebildete, und in den Estern enthaltene freie Phosphorsäure substrahieren.

Aus der Tabelle VIII b. ist ersichtlich, dass die Monobromessigsäure auf die Phosphatabspaltung der Hexosediphosphorsäure und Glyzerinphosphorsäure nur ganz geringen Einfluss hat, während das Embdenester überhaupt nicht gehemmt wird.

D Zusammenfassung.

Die Versuche haben ergeben, das die Einwirkung der Monobromessigsäure bei der Milchsäurebildung aus den Kohlehydraten nicht in der Aufhebung der Esterspaltung zu suchen ist, sondern in der völligen oder teilweisen Hemmung der Dehydrierungsvorgänge. Offenbar sind es die vorbereitenden Reaktionen für die Milchsäurebildung, deren Hemmung das Kennzeichen der Monobromessigsäurewirkung ist.

Literaturverzeichnis.

1.	Batelli u. Stern:	Die Oxydation der Bernsteinsäure durch Tiergewebe. Biochen. Ztschr. Bd. 30 (1910) . 172
2.	dieselben	Die Oxydation der Zitronen-, Aepfel- und Fumarsüure durch Tiergewebe. Ebenda Bd. 31 (1911) S. 478
3.	Dreser:	Histiochemisches zur Nierenphysiologie, Ztschr. für Biologie. Bd. 21 (1885) S. 941.
4.	Einbeck:	Ueber das Vorkommen von Bernsteinsäure im Fleischextrakt und im frischen Fleische. Hoppe-Seyler Bd. 87 (1913) S. 145.
5.	derselbe	Über das Vorkommen von Fumarsäure im frischen Fleische ebenda Bd. 90, (1914) S. 301
6.	Hahn u Haarmann:	Über die Dehydrierung der Bernsteinsäure. Zeitschrift für Biologie Bd. 87 (1928) S. 107.
7.	dieselben	und Bd. 89 (1930) S. 159
8.	dieselben	Über die Dehydrierung der Äpfelsäure, ebenda Bd. 87 (1928) S. 465.
9.	dieselben	und Bd. 88 (1929) S. 587.
10.	dieselb. u. Fischbach	Über die Dehydrierung der Milchsäure. ebenda Bd. 88 (1929) S. 516.
11.	dieselben	Über die Dehydrierung der Zitronensäure. ebenda Bd. 89 (1930) S. 332
12.	dieselben	Über den Abbau von Fruktosediphosphorsäure, Glycerinphosphorsäure und Propionsäure im Muskel ebenda Bd. 90, (1930) S. 231
13.	Hahn, Fischbach und Haarmann	Untersuchungen über Muskelkochsaft. ebenda Bd. 91 (1931) S. 315,
14.	Lohmann und Jendrassik	Kolorimetrische Phosphorsäurebestimmungen im Muskelextrakt z. Biochem. 178 (1926) S. 419.
15.	Schoenbein:	Über den Einfluß des Quecksilbers auf die chemische Tätigkeit des Sauerstoffs. Journal f. prakt. Chem. Bd. 55 (1852) S. 9
16.	Thunberg:	Studien über die Beeinflussung des Gasaustausches des überlebenden Froschmuskels durch verschiedene Stoffe. Skandinavisches Archiv Bd. 22 (1909) S. 435. u. Bd. 25 (1911) S. 37
17.	Thunberg:	Zur Kenntnis des intermediären Stoffwechsels und der dabei wirksamen Enzyme. ebenda Bd. 40 (1920) S. 1
18.	derselbe	Die Deutung der Methylenblaufärbung in dem System Bernsteinsäure-Enzyn-Mythylenblau. ebenda Bd. 35 (1918) S. 168.
19.	derselbe	A. a. O. S. 185
20.	derselbe	wie 17 a. a. O. S. 89
21.	Wieland:	Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge. Ergebnisse der Physiologie. Bd. 20 (1922) S. 477

Lebenslauf.

Ich wurde am 22. Januar 1906 in Gr. Lasken in Ostpreußen geboren, besuchte in Lyck und Königsberg die Oberrealschule und machte an letzterer im März 1927 die Reifeprüfung. Hierauf wandte ich mich dem zahnärztlichen Studium zu, bestand in Königsberg Ostern 1929 meine zahnärztliche Vorprüfung und legte im Winter 1930-31 in Münster das zahnärztliche Staatsexamen ab.